

根癌农杆菌对栝楼的遗传转化

雷和田¹, 宋经元¹, 祁建军¹, 张荫麟¹, 杨峻山¹, 郭志刚²

(1 中国医学科学院协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 2 清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要: 用根癌农杆菌侵染栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim.) 无菌苗后, 获得其冠瘿组织; 栝楼冠瘿组织经除菌后能在无激素的 MS 培养基上良好生长, 并合成冠瘿碱, 表明 Ti 质粒转化成功。栝楼冠瘿组织中最高蛋白含量为 130.6 mg/g (鲜重)。经 SDS-PAGE 检测其含有的蛋白种类与栝楼根含有的基本一样。研究表明, 利用栝楼冠瘿组织作为培养系统生产天花粉蛋白有很好的开发前景。

关键词: 栝楼; Ti 质粒转化; 冠瘿组织培养

中图分类号: Q 943, Q 78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2700(2001)01-0065-05

Genetic Transformation by Ti Plasmid in *Trichosanthes kirilowii*

LEI He-Tian¹, SONG Jing-Yuan¹, QI Jian-Jun¹, ZHANG Yin-Ling¹,
YANG Jun-Shan¹, GUO Zhi-Gang²

(1 Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Beijing 100094, China;

2 Department of Chemical Engineering of Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Transformed crown tissue cultures from *Trichosanthes kirilowii* Maxim. were established by Ti plasmid in C58 strains. The crown tissues grew well in free-hormone MS medium. Nopaline was inspected in the crown gall and this data showed that T-DNA of Ti plasmid had been transformed successfully. The content of proteins in the tissue was about 130.6 mg/g (fresh weight) which was inspected by compound-color methods and its TCN-protein was inspected by SDS-PAGE analysis. The study showed that the production of TCN proteins from crown tissue cultures may be developed in prospect.

Key words: *Trichosanthes kirilowii*; Ti plasmid; The crown culture

栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim.) 的块根俗称天花粉, 含有淀粉、皂甙、天花粉蛋白、多种氨基酸及糖类等成分 (Tsao 等, 1986)。Trichosanthes (TCN 纯的药剂制品 GLQ223) 是从栝楼的根中提取出来的蛋白质, 它具有抗病毒、抗肿瘤、抗糖尿病和免疫调节等功效; 尤其是在发现其具有抗艾滋病的功效后更加激发了人们对它的兴趣, TCN 和 TAP29 (Trichosanthes Anti-HIV protein 29Kda) 是最引人注目的两种蛋白 (Leun 等, 1986; McGrath 等, 1989)。

Brett 和 Hector (1994) 及邱德有 (1996) 等对栝楼发根培养产生天花粉蛋白进行了研究; 利用基因工程方法产生天花粉蛋白也有报道, 但离工业化生产都还有一定的距离。本

实验是利用根癌农杆菌 C58 (*Agrobacterium tumefaciens* C58) Ti 质粒 T-DNA 整合到栝楼细胞基因组中, 诱导冠瘿组织 (Crown gall tissues) 发生, 冠瘿组织离体培养时具有激素自主、增殖速度较常规细胞培养快, 且较毛状根培养易于大规模化生产等优点。利用冠瘿组织培养生产天花粉蛋白可能是一条新途径。

1 材料与方法

1.1 栝楼冠瘿组织的诱导和培养

取栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim) 种子, 先用自来水冲洗干净、晾干; 然后在超净工作台上用 0.1% 升汞消毒, 无菌水冲洗 3 遍, 接种到 1/2MS 培养基上; 一周后出现白色的幼根和嫩芽。生长 2 周后, 用胭脂碱型根癌农杆菌 C58 菌株感染栝楼无菌苗 (张荫麟等, 1995), 诱导出冠瘿瘤。然后, 把冠瘿组织放在含有 500 mg/L 羧苄青霉素的 MS 琼脂培养基上除菌, 待除尽菌后, 在不含激素的 MS 琼脂培养基上继代培养 (温度 25℃, 黑暗), 以便用于最适培养基的筛选、培养条件的优化等实验。

1.2 Ti 质粒转化的证实

称取新鲜的栝楼块根、冠瘿组织各 1 g, 研磨后离心 (5000r/min, 10 min), 用毛细管吸取上清液以及 Nopalin 和 Arginine 标准品点样在 Whatman 3 mm 滤纸上; 用缓冲液渗透滤纸, 然后电泳 (20v/cm), 当指示剂甲基绿跑到边缘时停止电泳, 顺方向取出电泳纸, 用热风吹干, 放入 0.002% 菲醌 (溶于无水乙醇和 10% NaOH (溶于 60% 乙醇) 等体积混合的染液中染色几分钟, 然后风干; 最后在 254 nm 紫外下观察、摄影 (Otten 等, 1978)。

1.3 冠瘿组织中总蛋白的测定

称取 50g 新鲜的栝楼块根、冠瘿组织, 加入 1:2 的 1×PBS (Phosphate Buffer Saline) pH7.2, 经破碎 (破碎机 (XHF-1), 30 s 3~4 次)、分散 (高速分散器, 30 s 3~4 次)、浸泡 (4℃, 1~2 d)、离心 (8000r/min, 15 min), 取 50 μL 上清液 + 950 μL dH₂O, 最后加入 5 mL 考马斯亮兰溶液; 然后用 721 分光光度计在 595 nm 处测定其 OD 值 (张龙翔, 1981)。用 SDS-PAGE 测定冠瘿组织中所含蛋白质的分子量 (Smbrook 等, 1992)。

2 结果与讨论

2.1 栝楼冠瘿瘤的诱导和除菌

用胭脂碱型根癌农杆菌 C58 菌株感染栝楼无菌苗的叶腋处, 获得冠瘿瘤, 诱导率为 80%; 然后把它们从茎上切下, 放在含有 500mg/L 羧苄青霉素的 MS 琼脂培养基上培养, 经 4 次转移获得无菌的冠瘿组织, 并筛选长势较好的冠瘿组织继代培养。

2.2 栝楼冠瘿组织基本培养基的筛选

把来自同一株系冠瘿组织分别接种到不含激素的 MS、WP、B5、67-V 琼脂培养基和液体培养基上进行培养, 培养条件为黑暗、25℃。结果 (表 1) 表明, 栝楼冠瘿组织在以上不同培养基上生长有明显差异, 其中以 MS 培养基中冠瘿组织生物量收获最大; 但总蛋白含量差异不大。

2.3 蔗糖浓度对栝楼冠瘿组织培养的影响

我们以 MS 为基本培养基, 比较了 15、20、30、40、50g/L 蔗糖浓度, 接种量为 30 g

(鲜重) /L, 培养 28 d 收获栝楼冠瘿组织生物量分别为 396.8, 415.4, 452.3, 428.5, 400.7g (鲜重) /L, 结果表明以 30g/L 蔗糖培养时冠瘿组织的收获量最大 (图 1)。

2.4 栝楼冠瘿组织细胞生长曲线及总蛋白含量的变化

选择 MS 为基本培养基, 接种量为 30 g (鲜重) /L, 蔗糖浓度为 30g/L, pH=5.6, 黑暗, 25℃ 为培养条件, 对栝楼冠瘿组织进行了悬浮培养, 观察其细胞生长状态和总蛋白含量的变化。结果 (图 2) 表明栝楼冠瘿组织在悬浮培养 16~18 d 期间生长速度最快, 为 34.45 (鲜重) g/L · d, 而总蛋白含量在 24 d 时达到最高值为 130.6mg/g (鲜重); 培养 28 d 栝楼冠瘿组织平均生长速度为 13.35g (鲜重) /L · d, 平均蛋白含量为 122.5mg/g (鲜重)。培养 27 d 时冠瘿组织开始老化, 所以我们选择悬浮培养 28d 时收获培养物。

表 1 不同基本培养基对栝楼冠瘿组织和总蛋白生产的影响

Table 1 The effect of different basic medium on the growth of crown tissue cultures and production of the total protein

Basic medium	Inoculum (g/L)	Culture days	Harvest biomass ^① (g/L)	Harvest biomass ^② (g)	Protein content ^① (mg/g)	Protein content ^② (mg/g)
MS	30.0	28	504.2	525.3	134.00	129.00
B5	30.0	28	485.4	492.4	129.23	128.12
67-V	30.0	28	453.2	476.5	130.19	127.98
WP	30.0	28	443.6	468.4	131.98	127.23

Notes: 1. The weight of crown tissue is fresh weight, 2. ①② cultured in solid and liquid media respectively

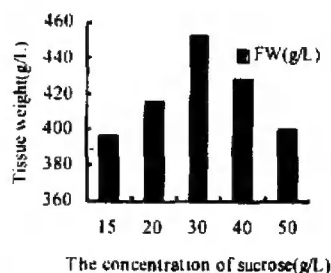


图 1 蔗糖浓度对栝楼冠瘿组织生长的影响

Fig.1 The effect of the concentration of sucrose on the growth of the crown tissues of *T. kirilowii*

FW: fresh weight

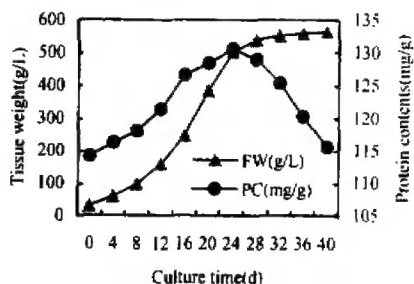


图 2 悬浮培养细胞生长曲线和蛋白含量变化

Fig.2 The time course of production - growth in the suspension

FW: fresh weight; PC: protein contents

2.5 栝楼冠瘿组织中冠瘿碱的检测

根癌农杆菌 C58 菌株 Ti 质粒的 T-DNA 含有胭脂碱合成酶基因, 而植物染色体中不含此基因。如果 Ti 质粒将该基因整合到植物染色体中, 那么在诱导出来的冠瘿组织中就

能检测到其表达产物胭脂碱, 则表明转化成功。我们用高压纸电泳检测了栝楼冠瘿组织两个株系, 结果表明都含有胭脂碱 (图 3-3), 证实了 Ti 质粒中的 T-DNA 已整合到栝楼冠瘿组织细胞染色体中, 并获得表达。

2.6 栝楼冠瘿组织中蛋白的检测

根据用标准蛋白求得的标准曲线 $Y = 199.63006R - 7.04429$, $R = 0.99957$ 计算出栝楼冠瘿组织中的蛋白含量。结果显示, 悬浮培养 24 d 时栝楼冠瘿组织蛋白含量达到最高, 为 130.6mg/g (鲜重)。用 SDS-聚丙烯酰胺电泳法测定栝楼冠瘿组织中所含蛋白质的分子量, 结果表明 (图 3-2), 冠瘿组织中含有的蛋白种类与栝楼块根中含有的蛋白基本相同; 且由于冠瘿组织培养具有激素自主、生长快速等优点, 为此, 利用栝楼冠瘿组织培养系统来生产天花粉蛋白很有开发潜力。

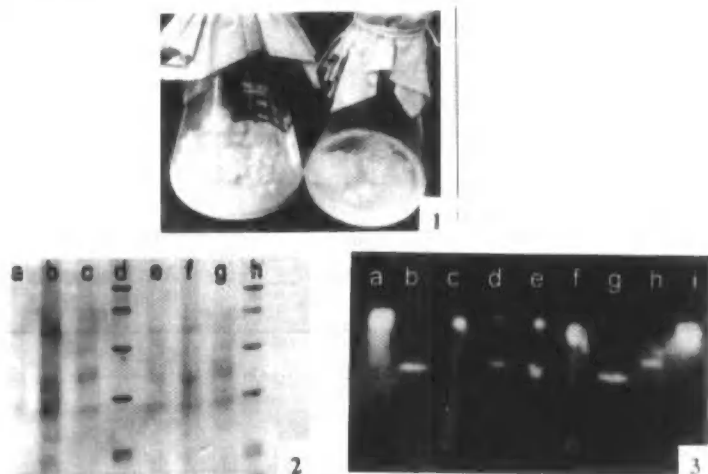


图 3 1. 用根瘤农杆菌 C58 感染栝楼无病毒后在无激素的 MS 培养基上培养 18 天的冠瘿组织;

2. SDS-聚丙烯酰胺电泳图, a, c, e, g: 栝楼冠瘿组织, b, f: 栝楼块根, h 标准分子量蛋白;

3. Ti 质粒转化证实图: a, i: arginine, h: octopine, b, g: nopaline, d, e 栝楼冠瘿组织, c, f: 栝楼块根。

Fig.3 1. Crown tissues induced from *T. kirilowii* which were cultured for 18 days on hormone-free media after being infected by *Agrobacterium tumefaciens* C58; 2. SDS-PAGE, a, c, e, g: crown tissues of *T. kirilowii*, b, f: roots of *T. kirilowii*, d, h: standard protein markers; 3. proofs of the transformation of Ti plasmid, a, i: arginine, h: octopine, b, g: nopaline, d, e: crown tissues, c, f: roots of *T. kirilowii*.

[参考文献]

张龙翔, 1981. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社

张荫麟, 宋经元, 祁建军等, 1995. 丹参的冠瘿组织培养和丹参酮的产生 [J]. 生物工程学报, 13 (3): 317-319

邱懿有, 朱至清, 1996. 利用栝楼毛状根培养系统生产天花粉蛋白的研究 [J]. 植物学报, 38 (6): 439-443

金冬雁, 黎孟祺等译, 1992. 分子克隆, [M] 北京: 科学出版社, 852-897

Brett J Savary, Hector E Flores 1994. Biosynthesis of defense-related proteins in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* var

japonicum (Kitum) [J]. *Plant Physiol*, 106: 1195 ~ 1204

Leun K N, Yeung H W, Leung S O, 1986. The immunomodulatory and antitumor activities of trichosanthin - an abortifacient protein isolated from Tian - hua - fen (*Trichosanthes kirilowii*) [J]. *Asian Pacific J Allergy Immunol*, 4: 111 ~ 120

McGrath M S, Hwang K M, Caldwell S E, 1989. GLQ223: An inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineages [J]. *PNAS USA*, 86: 2844 ~ 2848

Otten L A B M, Schitpermort R A, 1978. A rapid micro scale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities [J]. *Biochem Biophys Acta*, 78, 57: 497 ~ 604

Tsao S W, Yan K T, Yeung H W, 1986. Selective killing of choriocarcinoma cells in vitro by trichosanthin. a plant protein purified from root tubers of the Chinese medicinal herb *Trichosanthes kirilowii* [J]. *Toxicon*, 24: 831 ~ 840